ประเมินความเสี่ยงเชิงปริมาณของลิสทีเรียโมโนไซโตจีเนส ในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่

ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ

ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
*ผู้รับผิดชอบบทความ โทร.0-2218-9577-8 โทรสาร 0-2218-9577 E-mail : suphachai.n@chula.ac.th

บทคัดย่อ

Listeria monocytogenes (LM) เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งอัตราป่วยจนทำให้เสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 20-30 LM สามารถเข้าสู่ห่วงโซ่การผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ได้ตั้งแต่ฟาร์มจนถึงผู้บริโภค มีรายงานพบ LM ในเนื้อไก่ดิบสูงถึงร้อยละ 12-92 นอกจากนี้การส่งออกผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ในสภาวะเย็นซึ่งเอื้อต่อการเจริญเติบโตของ LM ดังนั้น เนื้อไก่ทั้งดิบและสุก จึงมีความเสี่ยงที่จะมี LM ปนเปื้อน การประเมินความเสี่ยงตามของคณะกรรมาธิการเกณฑ์อาหาร (Codex Alimentarius Commission) ยังไม่เป็นที่เข้าใจกันดีนัก และประเทศไทยมีการส่งออกผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ปริมาณมาก ในขณะที่ประเทศผู้นำเข้ารายสำคัญอย่างกลุ่มประเทศยุโรปได้กำหนดเกณฑ์จุลชีววิทยา (Microbiological criteria) ของ LM ในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่แล้ว จึงมีแนวโน้มว่าจะมีการกำหนดระดับความเสี่ยงที่ยอมรับได้ (Tolerable level of risk) ของผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการศึกษา จึงมุ่งที่จะประเมินความเสี่ยงเชิงปริมาณของ LM ในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่และใช้การศึกษานี้เป็นต้นแบบเพื่อประเมินความเสี่ยงจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษชนิดอื่นๆ หรืออาหารชนิดอื่นๆ ซึ่งรวมถึงประเมินความเสี่ยงอาหารเพื่อการบริโภคภายในประเทศด้วย เนื้อไก่ที่ออกจากโรงเชือดจำนวน 120 ตัวอย่างตรวจไม่พบ LM เลย อย่างไรก็ตาม เมื่อผนวกค่าความไม่แน่นอนกับค่าที่ได้จากผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการจะได้เป็นการแจกแจงความน่าจะเป็น (probability distribution) ของความชุกและความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 0.82 และ 0.04 cfu/กรัม ตามลำดับ และในกรณีที่แย่ที่สุดที่มีการเก็บรักษาระยะหนึ่งในโรงงานแปรรูปทำให้มี LM เพิ่มจำนวนขึ้นอีกเป็น 1.469 cfu/กรัม และเมื่อผ่านความร้อนในการแปรรูปที่ 70°ซ 1 นาทีแล้วทำให้ LM ลดลงเหลือ 0.58 cfu/กรัม ค่าเฉลี่ยการบริโภคเนื้อไก่ของคนไทย คือ 9.77 กรัมต่อคนต่อวัน นำมาคำนวณได้เป็นความน่าจะเป็นในการสัมผัสกับ LM (probability of exposure) เป็น 0.008196 ส่วนแบบจำลองทวีคูณใช้ในการหาความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วยจากการสัมผัสกับ LM (probability of illness) เป็น 2.87×10^{-12} สุดท้ายค่าเฉลี่ยความเสี่ยงของ LM ในการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ของคนไทยมีระดับต่ำมากเท่ากับ 9.48×10^{-15} ซึ่งถือว่ามีความปลอดภัยสูงมาก ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ คือ ความเข้มข้นและความชุก LM ในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ ดังนั้นการจัดการความเสี่ยงที่ได้ผล คือ การลดการปนเปื้อนของ LM ตลอดห่วงโซ่การผลิต

คำสำคัญ: การประเมินความเสี่ยงเชิงปริมาณ ลิสทีเรียโมโนไซโตจีเนส ผลิตภัณฑ์เนื้อไก่

บทนำ

Listeria monocytogenes (LM) เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food borne pathogen) ซึ่งจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขอย่างมาก เนื่องจากทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) การติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) และการแท้ง พบว่าอัตราป่วยจนทำให้เสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 20-30

LM ก่อให้เกิดปัญหาในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารเป็นอย่างมาก เนื่องจาก LM สามารถดำรงชีพในสิ่งแวดล้อมได้นานและยังสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 2-4 องศาเซลเซียส (Swaminathan, 1989) LM พบได้บ่อยในอาหารที่มาจากแหล่งของพืชและสัตว์ รวมทั้งอาหารที่ผ่านการปรุงสุกแล้ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารพร้อมบริโภค (ready to eat food) ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นม ไอศกรีม ผักดิบ เนื้อดิบ อาหารทะเล เป็นต้น (Farber, 1991; Swaminathan, 1989; Buchanan, 1989)

เนื้อไก่นับว่าเป็นเนื้อสัตว์ที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของ LM ได้ ซึ่งสามารถเข้าสู่ห่วงโซ่การผลิตได้ตั้งแต่ฟาร์ม โรงเชือด โรงงานแปรรูป การค้าปลีกจนถึงผู้บริโภค มีรายงานพบ LM ในเนื้อไก่ดิบสูงถึงร้อยละ 12-92 แสดงว่าสามารถพบได้ตั้งแต่ระดับฟาร์มไก่และกลายเป็นแหล่งที่มาของ LM ที่จะเข้าไปปนเปื้อนในโรงเชือดไก่ รวมทั้งอุปกรณ์และสิ่งแวดล้อมภายใน การปนเปื้อนของเชื้อในเนื้อไก่สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งก่อนและหลังการเชือดในโรงงานแปรรูปเนื้อไก่ แม้ว่า LM จะถูกทำลายได้เมื่อผ่านความร้อนในการปรุงอาหารตามปกติ แต่สำหรับเนื้อไก่สุก หรือเนื้อไก่พร้อมบริโภค (Ready to eat) ก็ยังคงพบปัญหาได้เช่นเดียวกัน โดยพบความเข้มข้น 103-104 cfu/กรัม ทั้งนี้ปัญหาอาจเนื่องจากการให้ความร้อนไม่เพียงพอหรือการปนเปื้อนหลังผ่านความร้อนแล้ว (post contamination) นอกจากนี้การส่งออกผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ในสภาวะเย็นเอื้อต่อการเจริญเติบโตของ LM ดังนั้น เนื้อไก่ทั้งดิบและสุกจึงมีความเสี่ยงสูงที่จะมี LM ปนเปื้อน (Farber and Peterkin, 1991; Glass and Doyle, 1989)

การประเมินความเสี่ยงตามคำแนะนำของคณะกรรมาธิการเกณฑ์อาหาร (Codex Alimentarius Commission) ยังไม่เป็นที่แพร่หลายโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศที่กำลังพัฒนา (Codex Alimentarius Commission, 1990) และประเทศไทยมีการส่งออกผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ปริมาณมาก ในขณะที่ประเทศผู้นำเข้ารายสำคัญอย่างกลุ่มประเทศยุโรปได้กำหนดเกณฑ์จุลชีววิทยา (Microbiological criteria) ของ LM ในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่แล้ว อย่างเป็นทางการภายใต้ Commission Regulation (EC) No 2073/2005 ดังนั้นจึงมีแนวโน้มว่าจะมีการกำหนดระดับความเสี่ยงที่ยอมรับได้ (Tolerable level of risk) ของผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการศึกษาจึงมุ่งที่จะประเมินความเสี่ยงเชิงปริมาณของ LM ในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่และใช้เป็นต้นแบบในการประเมินความเสี่ยงจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษอื่นๆ ในอาหารเพื่อการส่งออกอื่นๆ ด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

การวิเคราะห์ความเข้มข้น *Listeria monocytogenes* ในห้องปฏิบัติการ

วิธีการที่ใช้อ้างอิงจาก ISO 11290-2 First edition 1998-07-01 and Amendment 1 2004-10-15 Part 2 : Enumeration method, Amendment 1 : Modification of the enumeration medium

ชั่งตัวอย่างเนื้อไก่ 25 กรัม ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว Half-Fraser broth base 225 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้สัดส่วนการเจือจาง 1:10 จากนั้นผสมตัวอย่างและ Half-Fraser broth base ให้เข้ากันประมาณ 1 นาที จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่ 20°C เป็นเวลา 1 ชม. ดูดสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตรปล่อยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง Agar Listeria selon Ottaviani & Agosti (ALOA) เกลี่ยสารละลายทั่ว plate อย่างรวดเร็ว แล้วทิ้งไว้ 15 นาที นำไปบ่มเพาะที่ 37°C นาน 24 ชม. ถ้าเชื้อเจริญเติบโตน้อยให้บ่มต่ออีก 18-24 ชม. นับจำนวนโคโลนีที่มีสีเขียวอมฟ้า ขนาด 1-2 มม. รูปร่างกลม ขอบเรียบ และที่สำคัญต้องมีโซนทึบรอบโคโลนี

การเก็บตัวอย่างในโรงเชือดไก่

โรงเชือดที่ได้มาตรฐานเพื่อการส่งออกจากกรมปศุสัตว์โดยมีบริษัทเอกชนเป็นเจ้าของ จำนวน 4 แห่ง (บริษัท) ในจังหวัดสระบุรีและลพบุรี จำนวนเฉลี่ยของไก่เนื้อที่เข้าเชือดประมาณ 150,000 ตัวต่อวัน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างเนื้อไก่จำนวน 120 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์เนื้อไก่จากโรงงานแปรรูปจำนวน 220 ตัวอย่างเพื่อเป็นการยืนยันการวิเคราะห์ข้อมูล

วิธีการประเมินความเสี่ยงและแบบจำลอง (Model)

การประเมินความเสี่ยงตามแนวทางของคณะกรรมาธิการเกณฑ์อาหาร หรือ Codex Alimentarius Commision (CAC) ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ

1. การระบุอันตราย (Hazard identification) เป็นการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ลักษณะของเชื้อ การแพร่กระจาย ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต อาการและความเจ็บป่วย โดยสืบค้นข้อมูลและเอกสารหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ จากหน่วยงานของรัฐบาล เอกชน หรือสถาบันการศึกษา ความสำคัญของ LM ด้านความปลอดภัยที่มีผลกระทบต่อระบบการสาธารณสุขและระบบ การค้าระหว่างประเทศ

2. การอธิบายอันตราย (Hazard characterization) เป็นการประเมินหาความน่าจะเป็นในการเกิดความเจ็บป่วยจากการได้รับปริมาณ LM (dose) หรือ probability of illness (Pi) ซึ่งวิเคราะห์ได้จากความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเจ็บป่วย ภูมิคุ้มกันของร่างกาย และอาหารซึ่งเป็นสื่อนำ LM เข้าสู่ร่างกาย ในรูปแบบแบบจำลองความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อ และการตอบสนองต่อเชื้อ หรือ Dose response model ในการศึกษาครั้งนี้ใช้แบบจำลองทวีคูณ หรือ Exponential model (FAO/WHO, 2004)

$$Pi = 1 - EXP^{-rN} \qquad (2)$$

โดยที่ Pi คือ ความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วยจากการได้รับ LM

r คือ พารามิเตอร์กำหนดรูปร่างแบบจำลอง

N คือ จำนวนเซลล์ LM ที่รับเข้าสู่ร่างกาย (dose)

3. การประเมินการสัมผัส (Exposure assessment) เป็นการประเมินหาโอกาสในการได้รับ LM (dose) และ ปริมาณ LM ที่ได้รับ หรือ probability of exposure (P_E) (Cassin *et al.*, 1998) แบบจำลอง

ที่ใช้ในการหาปริมาณ LM ในระหว่างกระบวนการผลิต คือ แบบจำลองการเพิ่มจำนวนเชื้อ หรือ growth model (CFSAN and FSIS, 2003) แบบจำลองช่วงก่อนเพิ่มจำนวนทวีคูณ หรือ Lag phase duration model (LPD model) (Whiting and Bagi, 2002) และแบบจำลองการทำลายเชื้อ หรือ inactivation model (Kamolsiripichaiporn *et al.*, 2007) ดังสมการที่ 3-5

$$EGR_T = EGR_5 \left[(T + 1.18) / (6.18) \right]^2 \quad (3)$$

โดยที่ EGR_T คือ exponential growth rate ณ อุณหภูมิ T

EGR_5 คือ exponential growth rate ณ อุณหภูมิ 5°ซ (~ 0.0175 cfu/ชั่วโมง)

T คือ อุณหภูมิที่ LM เจริญเติบโต

$$\text{Log LPD (h)} = 1.619648 - 0.000337T_{prior} - 0.081914T_{growth} + 0.000350T_{prior}^2 + 0.001251T_{growth}^2 - 0.000591T_{prior}T_{growth} \quad (4)$$

โดยที่ LPD คือ Lag phase duration หรือ ช่วงก่อนการเพิ่มจำนวนทวีคูณของเชื้อ

T_{prior} คือ อุณหภูมิก่อนหน้าที่ LM อยู่มาก่อน

T_{growth} คือ อุณหภูมิปัจจุบันที่ LM กำลังเจริญเติบโต

$$\text{Log} \left(N_t / N_0 \right) = - t / D_T \quad (5)$$

โดยที่ Nt และ N0 คือ ความเข้มข้นของ LM ณ เวลา t และ ณ เวลาศูนย์ ตามลำดับ

t คือ ระยะเวลาในการให้ความร้อน ณ อุณหภูมิ T

D คือ เวลาในการทำลายเชื้อให้ลดลงร้อยละ 90 หรือ decimal reduction time

T คือ อุณหภูมิในการให้ความร้อน

ความน่าจะเป็นในการสัมผัสกับ LM อย่างน้อย 1 เซลล์ ใช้แบบจำลอง

$$P_E = P (1 - EXP^{-MC}) \quad (6)$$

โดยที่ P_E คือ ความน่าจะเป็นในการสัมผัส LM จากการบริโภคเนื้อไก่

P คือ ความชุก (prevalence) LM ในเนื้อไก่ (ร้อยละ)

C คือ ความเข้มข้น (concentration) LM ในเนื้อไก่ (cfu/กรัม)

M คือ ปริมาณการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ (กรัม)

4. การอธิบายความเสี่ยง (Risk characterization) เป็นการบูรณาการผลจาก 2 ขั้นตอนก่อนหน้าเข้าด้วยกัน เพื่อจะประมาณค่าความเสี่ยง (risk estimate) หรือ ความเจ็บป่วยที่จะเกิดขึ้นจากการได้รับสัมผัส LM ในผลิตภัณฑ์ไก่ (Cassin *et al.*, 1998) ใช้แบบจำลอง

$$\text{Risk estimate} = Pi \times P_E \quad (7)$$

โดยที่ Risk estimate คือ ค่าประมาณความเสี่ยง

Pi คือ ความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วยจากการได้รับ LM

P_E คือ ความน่าจะเป็นในการสัมผัส LM จากการบริโภคเนื้อไก่

การวิเคราะห์เชิงความน่าจะเป็น (Stochastic analyses)

เนื่องจาก การประเมินความเสี่ยงมีความเกี่ยวข้องกับความไม่แน่นอน (total uncertainty) ของทั้งข้อมูลและแบบจำลองที่ใช้ ดังนั้น การวิเคราะห์จึงต้องผนวกค่าความน่าจะเป็นเข้าไปในการวิเคราะห์ค่าของตัวแปรต่างๆ ด้วยในรูปของการแจกแจงความน่าจะเป็น (probability distribution) โดยอาศัยโปรแกรมสำเร็จรูป @Risk (Risk analysis add-in for Microsoft Excel Version 4.5.3 Professional Edition copyright 2004, Palisade Corporation) โดยแบ่งเป็น 3 ส่วนใหญ่ๆ คือ

1. การแจกแจงความน่าจะเป็นสำหรับความชุก (Beta distribution) เป็นการอาศัยหลักการกระบวนการทวินาม (Binomial process) กล่าวคือ ความชุกหรือการมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่สนใจนั้นมีความเป็นไปได้เพียง 2 กรณีเท่านั้น คือ มีการปนเปื้อนและไม่มีการปนเปื้อน

ความชุก LM ในไก่เนื้อ (within flock prevalence) เป็นการคำนวณความชุก LM ภายในฝูงไก่ โดยข้อมูลที่ต้องการทราบก่อน คือ จำนวนฝูงที่ทดสอบแล้วให้ผลบวกต่อ LM (infected) แต่เนื่องจากไม่ทราบความชุก LM ในฝูงไก่มาก่อนล่วงหน้า ดังนั้น ความชุกภายในฝูงไก่นี้ก่อนการทดสอบจึงเป็นการแจกแจงแบบสม่ำเสมอมีความชุกในช่วงระหว่างร้อยละ 0 และ 100 หรือเขียนเป็นแบบการแจกแจงความน่าจะเป็นว่า Uniform (0, 1) หลังจากทำการทดสอบแล้วจะได้การแจกแจงความน่าจะเป็นความชุกภายในฝูงเป็น Beta (1, 2) (Vose, 2000; Vose, 1998, 1997) โดยที่ 1 คือ s + 1 2 คือ n - s + 1 n คือ จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ s คือ จำนวนตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนด้วย LM (success)

ตัวอย่างการคำนวณความชุกภายในฝูง ถ้าจำนวนไก่ภายในฝูงที่เลี้ยง 120 ตัว พบว่า ไม่มีไก่ที่ให้ผลบวกกับการทดสอบหา LM ดังนั้น การแทนค่าในการแจกแจงความน่าจะเป็น Beta (0+1, 120-0+1) หรือ Beta (1,121) (ภาพที่ 1) ได้ค่าเฉลี่ยของความชุกภายในฝูง เป็นร้อยละ 0.082 แต่มีความเป็นไปได้ที่จะมีค่าความชุกเป็นค่าอื่นๆ ได้ด้วย เช่น ร้อยละ 0 ถึง ร้อยละ 100 แต่โอกาสการเกิดความชุกในค่าอื่นๆ นั้น มีระดับความเป็นไปได้ที่น้อยกว่าความชุกร้อยละ 0.082

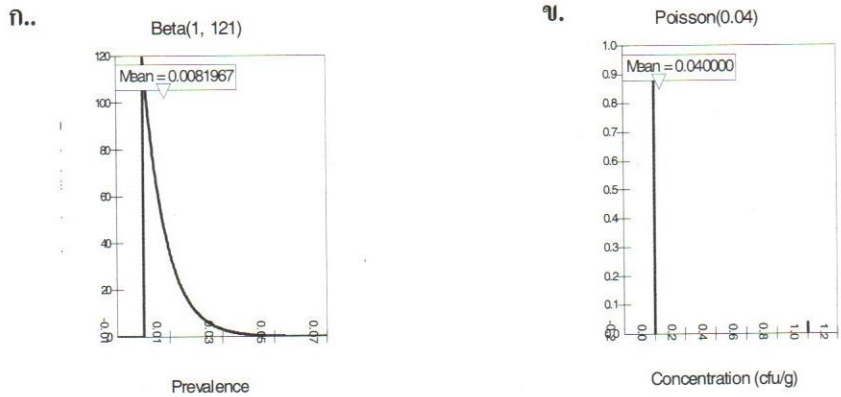
2. การแจกแจงความน่าจะเป็นสำหรับความเข้มข้น (Poisson Distribution) ระดับความเข้มข้นของจุลินทรีย์ในตัวอย่างนั้น จะสอดคล้องกับแบบการแจกแจงแบบ Poisson ซึ่งมีการกำหนดค่าพารามิเตอร์ λ เพื่อสร้างการแจกแจงความน่าจะเป็น ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ ก็คือ ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของ LM ในตัวอย่างที่ศึกษา (ภาพที่ 1)

3. การจำลองเหตุการณ์จริงโดยวิธีมอนติคาร์โล (Monte Carlo Simulation) ตัวแปรในเชิงการแจกแจงความน่าจะเป็น ไม่สามารถใช้ค่าเฉลี่ย (mean) มาคำนวณหรือวิเคราะห์ในสมการหรือแบบจำลองต่างๆ เนื่องจาก จะได้ผลลัพธ์ที่ผิดพลาด ดังนั้น จึงจำเป็นต้องอาศัยการจำลองเหตุการณ์จริงโดยวิธีมอนติคาร์โล โดยทำการจำลองเหตุการณ์ (simulation) เป็นจำนวน 10,000 รอบ (iteration)

ผลการทดลอง

ความชุกและความเข้มข้นเริ่มต้น ณ โรงเชือด

เนื้อไก่ดิบ 120 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบ LM เลย ดังนั้น ความชุก (deterministic prevalence) คือ ร้อยละ 0 ในขณะที่ค่าเฉลี่ยการแจกแจงความน่าจะเป็นความชุก (probabilistic prevalence) หรือ Beta (1, 121) คือ ร้อยละ 0.82 ดังภาพที่ 1ก เนื่องจาก การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการใช้น้ำหนักไก่ 25 กรัม ซึ่งหากตรวจไม่พบ LM เลย แสดงว่า มี LM ไม่เกิน 1/25 หรือ 0.04 กรัม ได้ค่าเฉลี่ยการแจกแจง ความน่าจะเป็นความเข้มข้น Poisson (0.04) เท่ากับ 1 cfu/กรัม (เนื่องจาก Poisson เป็นเลขจำนวนเต็ม เท่านั้น) ดังภาพที่ 1ข



ภาพที่ 1 การแจกแจงความน่าจะเป็น LM จาก 120 ตัวอย่าง
ก. ความชุกกรณีที่ไม่มีตัวอย่างที่ผลบวก
ข. ความเข้มข้นที่เป็นไปได้ คือ 0 และ 1 cfu/g เท่านั้น

โรงงานแปรรูปเนื้อไก่

สรุปขั้นตอนและระยะการเก็บรักษากรณีที่นานที่สุด (worst-case scenario) ในโรงงานแปรรูป ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเก็บรักษาและการเจริญเติบโตของ LM ในแต่ละขั้นตอนของโรงงานแปรรูป

ขั้นตอน	การเก็บรักษา		LPD*	Growth time	EGR**	Growth
	(°ซ)	(ชม.)	(ชม.)	(ชม.)	(log cfu/ชม.)	(log cfu)
การขนส่งสู่โรงงานแปรรูป	7	4	12	0	0.031	0
การจัดเก็บ	4	48	20	28	0.012	0.339
การหมักและการพักรอ	7	48	12	36	0.031	1.090

* LPD : Lag phase duration ระยะเวลาก่อนการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ **EGR : Exponential growth rate "อัตราการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ"

เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาระยะเวลาก่อนการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ หรือ LPD จากสมการที่ 4 หากว่า LPD นานกว่าระยะเวลาในการเก็บรักษา ก็ถือว่า ไม่มีการเพิ่มจำนวน LM ในขั้นตอนนั้นๆ ในทางตรงกันข้าม การเพิ่มจำนวน LM คำนวณได้จากผลคูณของอัตราการเจริญเติบโต (EGR) จากสมการที่ 3 และ ระยะเวลาการเจริญเติบโต (Growth time) ซึ่งได้จากระยะเวลาการเก็บรักษาหักด้วย LPD (ตารางที่ 1)

ความเข้มข้น LM ในเนื้อไก่ดิบ เริ่มต้น 0.04 cfu/กรัม และเมื่อรวมกับการเจริญเติบโตในระหว่างการเก็บรักษา 0.339 และ 1.090 log cfu/กรัม ดังนั้น เนื้อไก่ดิบก่อนการแปรรูปด้วยความร้อนมีความเข้มข้น LM เท่ากับ 1.469 cfu/กรัม

การแปรรูปโดยการให้ความร้อนในกรณีที่แย่ที่สุด (worst-case scenario) คือ อุณหภูมิ 70°ซ นาน 1 นาที ค่า D_{70} คือ 0.588 นาที (Mackey *et al.*, 1990) แทนค่าในสมการที่ 5

$$\text{Log } N_t = \log 1.469 - (1/0.588) = -0.232 \text{ log cfu/กรัม}$$
$$N_t = 0.5863 \text{ cfu /กรัม}$$

ดังนั้น หลังจากผ่านความร้อนแล้ว ความเข้มข้น LM ในเนื้อไก่ปรุงสุกเพียง 0.59 cfu/กรัม ทั้งนี้ขออนุมานว่า ความชุก LM ในเนื้อไก่มีค่าคงที่ตั้งแต่โรงเชือดไก่เป็นต้นมา

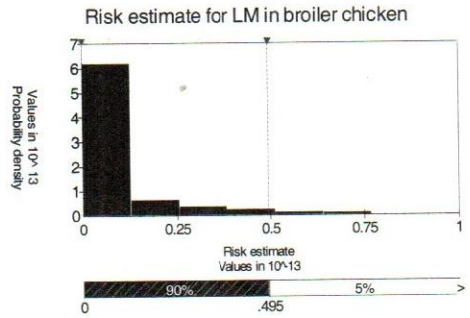
ค่าเฉลี่ยการบริโภคของทั้งเพศชายและเพศหญิง คือ 9.77 กรัมต่อคนต่อวัน โดยอาศัยแบบการแจกแจงความน่าจะเป็น LogNormal ดังนั้น ความน่าจะเป็นในการสัมผัสกับ LM คือ

$$P_E = 0.008197 (1 - EXP^{-45 * 0.59}) = 0.008196$$

สำหรับการวิเคราะห์ความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วย กำหนดให้พารามิเตอร์ r มีค่าเปอร์เซนต์ไทล์ที่ 5 และ ที่ 95 คือ 2.7×10^{-13} และ 9.3×10^{-12} ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.9×10^{-12} และเมื่อแทนค่าปริมาณ LM ที่ได้รับ คือ 26.55 cfu คือ

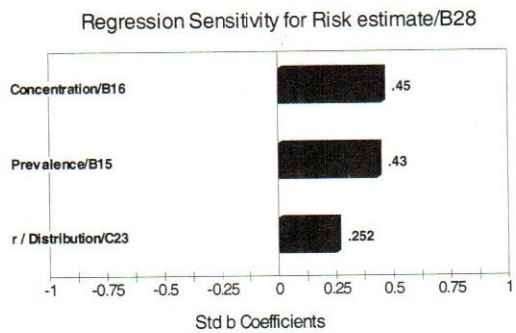
$$Pi = 1 - EXP^{(-4.9x10^{-12}x\ 26.55)} = 2.9 \times 10^{-12}$$

จากสมการที่ 7 ทำให้สามารถคำนวณหาค่าประมาณความเสี่ยง (risk estimate) ของ LM ในการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อไก่สำหรับคนไทยต่อคนต่อวัน ได้ค่าต่ำสุด ค่าเฉลี่ย และค่าสูงสุด เป็น ศูนย์, 9.48×10^{-15} และ 2.82×10^{-13} ตามลำดับ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การแจกแจงความน่าจะเป็นของค่าประมาณความเสี่ยงของ LM ในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ของคนไทย

การวิเคราะห์หาปัจจัยเสี่ยงของ LM ในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ พบว่า ความเข้มข้นและความชุก LM ในเนื้อไก่ดิบในขั้นตอนการประเมินการสัมผัส พารามิเตอร์ r ในขั้นตอนการอธิบายอันตรายมีความสัมพันธ์เชิงเส้น (regression) กับค่าประมาณความเสี่ยง (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์เชิงเส้นหรือปัจจัยเสี่ยงในกระบวนการประเมินความเสี่ยง

วิจารณ์

สำหรับการเฝ้าระวังหรือการสำรวจตามแนวทางเดิมนั้น แม้ว่าการเก็บตัวอย่างเนื้อไก่จากโรงเชือดจะไม่มีตัวอย่างใดที่ให้ผลบวกต่อ LM เลย ก็จัดได้ว่า ความชุกและความเข้มข้นของ LM เป็นศูนย์ อย่างไรก็ตาม สำหรับองค์ประกอบของความเสี่ยง จะมีความไม่แน่นอน (total uncertainty) เข้ามามีบทบาทด้วย ซึ่งองค์ประกอบนี้จัดว่ามีความสำคัญมากและเป็นพื้นฐานแนวคิดของการประเมินความเสี่ยง เนื่องจาก การเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบนั้นมิได้นำผลิตภัณฑ์อาหารทั้งหมดมาตรวจสอบ ค่าที่ได้จึงเป็นเพียงตัวแทนหรือเป็นตัวอย่างตามชื่อที่เรียกเท่านั้น ซึ่งการตรวจไม่พบ LM ในตัวอย่างมิได้หมายความว่า ผลิตภัณฑ์ทั้งหมดจากที่ชักตัวอย่างออกมาตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการนั้น จะปลอด LM ทั้งหมดเสมอไป ดังนั้น ขั้นตอนการประเมินการสัมผัส จึงได้รายงานความชุกและ ความเข้มข้น LM ในรูปแบบการแจกแจงความน่าจะเป็น (ภาพที่ 1) ยกตัวอย่างกรณีค่าเฉลี่ยของการแจกแจงความน่าจะเป็นความชุก Beta (1,121) เป็นร้อยละ 0.82 นั้น ค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดของ ความชุกคือ ร้อยละ 0 ถึง ร้อยละ 100 ตามลำดับ แต่ค่าความชุกมีความเป็นไปได้สูงสุดที่ร้อยละ 0 ซึ่งตรงกับการคำนวณความชุกตาม

แนวทางการวิเคราะห์ทั่วไปนั่นเอง

การประเมินการสัมผัสจนถึงการประเมินความเสี่ยงในครั้งนี้เป็นการประเมินในกรณีที่แย่ที่สุด (worst case scenario) หมายความว่า ข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์จะก่อให้เกิดความเสี่ยงหรือ ผลกระทบต่อผู้บริโภคสูงสุด เช่น การเก็บรักษาเนื้อไก่ในโรงงานแปรรูปที่นานที่สุดเท่าที่โรงงานจะยอมรับในการผลิต หรือ การเลือกอุณหภูมิต่ำสุดในการแปรรูปความร้อน (70°ซ) ซึ่งโดยปกติแล้วโรงงานจะแปรรูป ณ อุณหภูมิสูงกว่านี้ เป็นต้น ดังนั้น ค่าประมาณความเสี่ยงที่ได้จะเป็นกรณีที่แย่ที่สุดที่จะพึงเกิดขึ้นกับคนไทยได้ ดังนั้น หากว่าค่าสูงสุดของค่าประมาณความเสี่ยงยังอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ นั่นหมายความว่าระบบการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อไก่สำหรับการบริโภคของคนไทยจึงมีความปลอดภัยในระดับสูงสุดนั่นเอง

สำหรับการแปลผลค่าประมาณความเสี่ยงอาจจะพิจารณาได้เป็น 2 ระดับ คือ ปัจเจกบุคคล (individual) และประชากร (population) เช่น ความเสี่ยงสูงสุดของ LM ในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ที่คนไทยบริโภคในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งเป็นกรณีที่แย่ที่สุด เท่ากับ 2.82×10^{-13} หมายความว่า ปัจเจกบุคคลเดียวกันนี้จะต้องบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อไก่นี้จำนวนสิบล้านล้านครั้ง (10^{13} ครั้ง) จึงจะเกิดการเจ็บป่วยประมาณ 3 ครั้ง หรือ หมายความว่า ประชากร จำนวน 60 ล้านคนบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อไก่นี้จำนวนแสนวันหรือ 273 ปี จึงจะมีประชากรป่วยประมาณ 4 ราย ดังนั้น จะเห็นได้ว่า ระดับความเสี่ยงที่ได้มีระดับที่ต่ำมากๆ มีเกณฑ์หยาบๆ ในการแบ่งระดับความเสี่ยง คือ หากว่าความเสี่ยงต่ำกว่า 10^{-6} เรียกว่า ระดับที่ละเลยได้ (negligible) (Agriculture, Fisheries and Forestry - Australia, 2001) หรือ อาจจะพออนุมานว่าไม่มีความเสี่ยงก็ได้ (zero risk) สำหรับความเข้าใจของบุคคลทั่วไป

ข้อควรระวังในการประเมินความเสี่ยงเชิงปริมาณ คือ การจำลองเหตุการณ์จริง (simulation) กล่าวคือ ตัวแปรที่ไม่ทราบค่าที่แน่นอน จึงต้องกำหนดค่าตัวแปรในรูปการแจกแจงความน่าจะเป็น (probability distribution) ซึ่งเป็นการกำหนดโอกาสหรือความน่าจะเป็นของค่าต่างๆ ที่เป็นไปได้ทั้งหมด (ภาพที่ 1) ในขณะที่การอธิบายอันตราย การประเมินการสัมผัสและการอธิบายความเสี่ยงต้องอาศัยแบบจำลอง (model) หรือสมการในการวิเคราะห์ ซึ่งหากใช้ค่าเฉลี่ยในการคำนวณแล้วจะทำให้ได้ค่าที่ผิดพลาด เช่น กรณีค่าเฉลี่ยความเสี่ยงที่ได้จากการคำนวณทั่วไปในสมการได้เท่ากับ 2.3×10^{-14} ในขณะที่ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการใช้เทคนิคการจำลองเหตุการณ์จริงโดยวิธีมอนติคาร์โล (Monte Carlo Simulation) เท่ากับ 9.48×10^{-15} จะสังเกตได้ว่าค่าเฉลี่ยจากการคำนวณทั่วไปในสมการผิดพลาดจากค่าเฉลี่ยที่แท้จริงมากกว่า 2 เท่า

ความสัมพันธ์เชิงเส้นที่วิเคราะห์โดย regression sensitivity เป็นคุณสมบัติพิเศษของโปรแกรมสำเร็จรูป @Risk ที่ช่วยแนะแนวทางในเชิงการจัดการความเสี่ยง เพื่อควบคุมหรือลดระดับความเสี่ยงสุดท้ายในอาหาร ซึ่งจากการศึกษานี้ พบว่า ความเข้มข้นและความชุกของผลิตภัณฑ์เนื้อไก่เป็นปัจจัยเสี่ยงที่มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงของ LM ในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่มากกว่าปัจจัยอื่นๆ ดังนั้นแนวทางการจัดการความเสี่ยง ก็คือ การพยายามควบคุมหรือลด LM ที่ปนเปื้อนเข้ามาในห่วงโซ่อาหารตั้งแต่เนื้อไก่ดิบ เนื่องจาก LM สามารถเจริญเติบโตได้ในเนื้อไก่เมื่อแรกปนเปื้อนเข้ามาตั้งแต่ในโรงเชือดไก่และระหว่างการเก็บรักษาในโรงงานแปรรูปด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัย น.สพ.พงษ์ธร พุ่มแตงอ่อน และ สพ.ญ.ปรัชญา อยู่เอี่ยมยุทธ์ ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

Agriculture, Fisheries and Forestry (AFFA) - Australia 2001. Import risk analysis for animals and animal products. In: Guidelines for Import Risk Analysis. Biosecurity Australia, Australia. p.119.

Buchanan, R.L. 1989. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 52: 844-851.

Cassin, M.H., Lammerding, A.M., Todd, E.C., Ross, W., and McColl, R.S. 1998. Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. Int. *J. Food Microbiol.* 41: 21-44.

Center for Food Safety and Applied Nutrition and Food Safety and Inspection Service (CFSAN and FSIS). 2003. Interpretive summary: quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Washington, D.C. U.S.A. p. 541.

Codex Alimentarius Commission 1990. Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Assessment. CAC/GL 30. CAC, Italy. p.6.

FAO/WHO 2004. Hazard characterization. In: Risk Assessment of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-eat Foods: Interpretive Summary. WHO, Switzerland. p.269.

Farber, J.M. 1991. Symposium on microbiology update: old friends and new enemies. *Listeria monocytogenes*. *J Assoc. Off. Anal. Chem.* 74: 701-704.

Farber, J.M., and Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol. Rev. 55: 476-511.

Glass, K.A., and Doyle, M.P. 1989. Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1565-1569.

Kamolsiripichaiporn, S., Subharat, S., Udon, R., Thongtha, P., and Nuanualsuwan, S. 2007. Thermal inactivation of foot-and-mouth disease viruses in suspension. Appl. Environ. Microbiol. 73: 7177-7184.

Mackey, B., Pritchet, C., Norris, A., and Mead, G. 1990. Heat resistance of Listeria: strain differences and effects of meat type and curing salts. Lett. Appl. Microbiol. 10: 251-255.

Swaminathan, B. 1989. *Listeria monocytogenes.* In: Foodborne Bacterial Pathogens. Dekker, USA. p.796.

Vose, D. 2000. Stochastic processes. In : Risk Analysis: A Quantitative Guide. Wiley, USA. p. 418.

Vose, D.J. 1997. Risk analysis in relation to the importation and exportation of animal products. Rev. Sci. Tech. 16: 17-29.

Vose, D.J. 1998. The application of quantitative risk assessment to microbial food safety. *J. Food Prot.* 61: 640-648.

Whiting, R.C., and Bagi, L.K. 2002. Modeling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. Int. *J. Food Microbiol.* 73: 291-295.

Quantitative Microbial Risk Assessment of *Listeria monocytogenes* in Broiler Chicken

Suphachai Nuanualsuwan

Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri Dunant road, Patumwan, Bangkok. 10330 Tel. 02-218-9577-8 Fax. 02-218-9577

*Corresponding author E-mail : suphachai.n@chula.ac.th

Abstract

Listeria monocytogenes (LM) is a foodborne pathogen with mortality rate up to 20-30%. LM can contaminate into the broiler chicken throughout the food chain production. Prevalence of LM in raw chicken was about 12-92%. Additionally LM could survive and growth in the cold chain for exporting broiler chicken. Quantitative microbial risk assessment as recommended by Codex Alimentarius Commission (CAC) was not well understood. While Thailand is a leading exporter of chicken, European Union has established microbiological criteria for LM in broiler chicken. Then tolerable level of risk will be soon established. Therefore the objectives of this study were to assess the risk for LM in broiler chicken and demonstrate the prototype of quantitative microbial risk assessment to use for other foodborne pathogens or other types of food. The broiler chicken from broiler processing plant up to 120 samples found no LM at all. However combining the uncertainty and laboratory findings resulted in the probability distribution of LM prevalence and concentration of 0.82% and 0.04 cfu/g. In the worst-case scenario in the further processing plant LM concentration increased to be 1.469 cfu/g. Once undergone heat treatment at 70°C 1 min., LM concentration became 0.58 cfu/g. Average broiler chicken consumption of Thai people was about 9.77 g/head/day. Taking into account all these data for exposure assessment, probability of exposure of LM was 0.008196. The exponential model was used to calculate probability of illness which was 2.87×10^{-12}. The mean of riks estimate for LM in broiler chicken was as low as 9.48×10^{-15} considered as negligible. Risk factors for this broiler chicken production were concentration and prevalence of LM in cooked broiler chicken. So, suggested risk manangement option is to control LM throughout the broiler chicken production.

Keyword : Quantitative Microbial Risk Assessment, *Listeria monocytogenes*, Broiler Chicken